

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-18401

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)1月27日

C 08 B 37/08
A 61 K 31/73

A B S
A B X

7133-4C
7252-4C

※審査請求 未請求 発明の数 1 (全15頁)

⑭ 発明の名称 結合組織病理において有効な医薬の製造に使用する多糖およびオリゴ糖

⑰ 特 願 昭61-163490

⑱ 出 願 昭61(1986)7月11日

優先権主張 ⑳ 1985年7月12日 ㉑ フランス(FR) ㉒ 8510788

㉓ 発 明 者 ラディラ・ロベール フランス国、94440・サントニー、リュ・ジャンーバプティスト・リュリ、7

㉔ 発 明 者 ウィリアム・オルンベック フランス国、78000・ヴェルサイユ、ブルヴァール・ドユ・ロワ、10

㉕ 発 明 者 モーリス・プチトゥ フランス国、75013・パリ、リュ・ドュ・ジャヴロ、27

㉖ 出 願 人 サ ノ フ イ フランス国、75008・パリ、アヴェニュー・ジョルジュ・サンク、40

㉗ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

結合組織病理において有効な医薬の製造に
使用する多糖およびオリゴ糖

2. 特許請求の範囲

(1) 結合組織の病理に対して有効な薬剤としてのグリコサミノグリカン(GAG)及び/又はGAG断片の必要な場合には薬理学的に許容される塩の形態での使用。

(2) 使用GAGがヘパリン又はヘパラン硫酸中にみられる繰返し基本単位D-グルコサミン-ウロン酸(L-イズロン酸又はD-グルクロン酸)をベースとすることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の使用。

(3) GAGがヘパリン又はヘパラン硫酸であることを特徴とする特許請求の範囲第2項に記載の使用。

(4) GAGがヘパリン又はヘパラン硫酸より小さ

い分子量特に約10,000ドルトン未満の分子量(PM)をもつことを特徴とする特許請求の範囲第2項に記載の使用。

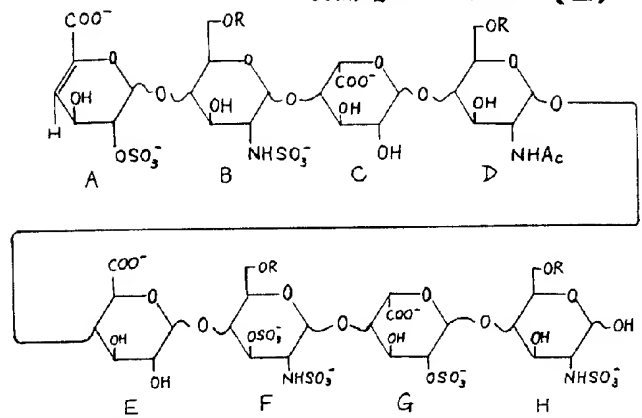
(5) GAGが

ヘパリンのアルコール抽出によって生成され、分子量約2000~8000の鎖の混合物から形成され、Yin-Wessler価/USP価の比が2以上特にYW/USP比が3~5のオーグであり平均分子量約3000~5500のCY 216と指称されるムコ多糖、

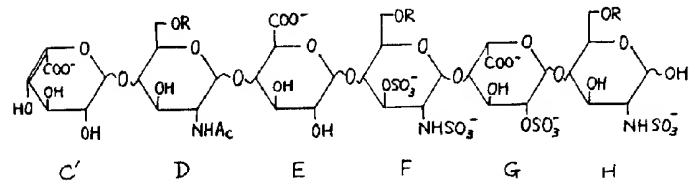
亜硝酸によるヘパリンの調整重合によって生成され、前記の一般的特徴を有しており、2,5-無水マンノ構造の残基で終結するムコ多糖、特に2,5-無水マンニール末端をもつCY222と指称されるムコ多糖又は2,5-無水マンノン酸末端をもつムコ多糖であって、大部分が2000~3000のオーグ特に約2000~2800のPMをもちYin-Wessler価が200u/μ以上でYin-Wessler価/USP価の比が特に10以上であるムコ多糖、

—主として、(1)平均分子量3000～6000ドルトン特に約4000～5000で、(2)YW/USP価が10未満特に約6～3で、(3)2,5-無水マンノ構造の基本単位で終結する鎖から形成されるムコ多糖、

—8個以上の糖基本単位から形成され、2000u/μgに達し得る高いYin-Wessler価と実質的に0の低いUSP価とをもち、AT-IIIに対する高いアフィニティをもつオリゴ糖であり、亜硝酸による調整重合によって生成され、2,5-無水マンノ構造の残基で終結し、ヘパリナーゼによるヘパリンの調整重合によって生成され、不飽和ウロン基本単位に対応する鎖初端基本単位を含み、特に次式で示されるABCDEFGH構造の8糖、



—前記8糖をヘパリナーゼによる調整作用により処理して得られた6糖の均質組成物特に次式で示される組成物、



—特にアルコール抽出によって得られる例えばCY 216、又はヘパリンの^亜硝酸解重合によって得られ

る例えばCY222の如き抗トロンビン活性をもつムコ多糖をSephadexの如き材料で浚過して得られた、又はイオン強度勾配によるクロマトグラフィーによって得られた均一重合度のオリゴ糖又は多糖

—ヘパリンに過ヨウ素酸塩を作用させ次に塩基性媒体中で処理して得られたGAG、

—動物器官の処理によって得られたGAG組成物の如き所謂完全GAG、

—ヘパリナーゼ又は亜硝酸によるヘパリンの解重合とATIIIへの固定配列をもつ画分の分離とこれら画分のゲル浚過とにより得られた種々の重合度をもつGAG断片、例えば重合度が12より大きい断片及び12未満の断片特に12,10,8,6,又は4の断片から成るGAG断片、

から選択されることを特徴とする特許請求の範囲第4項に記載の使用。

(6) 使用GAGが例えばデルマトン硫酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸又はヒアルロン酸

中にみられるD-ガラクトサミン-ウロン酸の繰返し基本単位をベースとし、特に上記の化合物自体で構成されることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の使用。

(7) 使用GAGが重合度に関して均質であり特に偶数の重合度をもつ鎖から形成されることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第6項のいずれかに記載の使用。

(8) 使用GAGが修正された硫酸化プロフィールを有しており、このGAGが例えば前記に定義した物質のうちの基-OHの一部又は大部分または時には全部が硫酸エステル基SO₃⁻で置換された物質の1つから成ることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第7項のいずれかに記載の使用。

(9) GAGの硫酸化度が2～4の範囲であることを特徴とする特許請求の範囲第8項に記載の使用。

(10) GAGが経口投与、注射、直腸投与に適した形態又は軟膏、エアゾール又はリボソームの形態

の薬剤組成物であることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第9項のいずれかに記載の使用。

(11) 注射液が、皮下注射で投与される溶液のときは1~200mg/ml好ましくは20~150mg/mlのGAGを含んでおり静脈注射又は灌流によって投与される溶液は30~100mg/ml特に40~50mg/mlのGAGを含むことを特徴とする特許請求の範囲第10項に記載の使用。

3. 発明の詳細な説明

本発明は結合組織の病理に有効な医薬を得るための多糖又はオリゴ糖の使用に係る。

これら病理において、心血管疾患、骨関節疾患、肺疾患及びその他の老人病及び突起例えば悪性腫瘍によって不能が生じ、このような不能の頻度及び状態はしばしば年令と共に指数的に増加及び悪化する。

これらの疾患の正確なメカニズムは完全には解明されていない。しかし乍ら、ある種の細胞メカ

この現象に関与するエラスターゼは多くの場合白血球エラスターゼ及びモノサイトーマクロファージのエラスターゼに対応する。これらは夫々、セリンプロテアーゼと金属プロテアーゼとを意味する。

上記のその他の疾患においてもまた、ある種のプロテアーゼ、しばしばエラスターゼのタイプのプロテアーゼの活性が増加することが観察される。血管平滑筋肉細胞の細胞膜に固定したエラスターゼのタイプのプロテアーゼ(セリンプロテアーゼ)の生合成が指数的に増加すること、及び、インビトロで線維芽細胞中の金属プロテアーゼのタイプのエラスターゼが培地に分泌され細胞集団の増倍数即ち熟成に伴って増加することが最近判明した。

これらエラスターゼとその阻害物質との比のアンバランスは、エラスターゼが極めて多量に分泌されるため、エラスターゼ阻害物質の欠陥が存在

ニズムと分子メカニズムとの存在が知られており、このようなメカニズムは特に、弾性組織分解活性をもつプロテアーゼ/抗プロテアーゼの比のアンバランス、より詳細にはエラスターゼ(特に白血球エラスターゼ)/抗エラスターゼの比のアンバランスに関与する。

例えば、ある種の肺疾患例えば肺気腫又は血管疾患例えば動脈硬化症に対してエラスターゼ/エラスチン系とそれらの阻害物質とが関与することは公知である。

また、肺の弾性組織分解が肺気腫の進行の初期基本段階であることも一般に認められている。このような弾性組織分解は、エラスターゼ阻害物質(インヒビター)の割合の減少又はその失活又は組織局部での弾性組織分解活性の増加に起因する。

従ってエラスターゼ/エラスターゼ阻害物質(インヒビター)の比はこの種の病理の進行の主要要因である。

するため特に α -1プロテアーゼ阻害物質即ち α -1抗トリプシン(以後 α -1PIと指称)が欠如しているために生じる。このアンバランスの理由としてまた、エラスターゼが弾性繊維に迅速に吸着され阻害物質に接近できないことがある。

現在までこの種の疾患に対して普遍的許容及び適用される有効な薬剤が存在しなかった。

例えば肺気腫を治療するには、一般に天然又は合成の阻害物質を使用する。天然阻害物質は、主として供与者に由来の α -1PIである。この阻害物質は肺気腫受容体中に灌流される。 α -1PIの生物期間が極めて短いので、反復治療の必要があり従って臨床使用が難しい。

インビトロで有効なエラスターゼの合成阻害物質、例えばクロロメチルケトンペプチド又はフッ化スルホニルは、インビボでは重大な欠点を生じる。これらの選択率は実際極めて低くまた毒性もとうてい無視できない。更に、肺気腫を誘発する

エラスターゼの気管内注入の以前又は以後の短時間内に注射しなければ効果がない(その効力は酵素の活性部位との接触の速さに左右される)。

発明者等はこの分野での研究によって、凝血に対する調整特性をもつことが既知のある種の多糖又はオリゴ糖を使用すると弾性組織分解活性をもつプロテアーゼに対して有効な薬剤が得られることを知見した。この薬剤は高い選択性をもち効力が大きく副作用を実質的に生じない。

従って本発明の目的は、プロテアーゼと抗プロテアーゼとのアンバランスが関与する結合組織の病理に有効な新規な薬剤を提供することである。本発明の目的はまた、これらの系のアンバランスの原因となる要因を予防及び治療するために薬剤を種々の投与形態で使用することである。

本発明によれば、結合組織の病理に対して有効な薬剤を得るためにグリコサミノグリカン又はグリコサミノグリカンの断片が使用される。これは

アルコール抽出又は亜硝酸もしくは酵素による解重合によって鎖の割合を増加させ、凝血因子Xaに対してより特異的な活性をもつGAGを生成し得る。

これら組成物の特徴は、Yin-Wessler価(抗トロンビン活性を示す抗Xa活性の尺度)とUSP価(総凝血活性の尺度)との比がヘパリンより高いこと即ち1より大きいことである。

ある種のGAGにおいてはUSP価は実質的に0になりYW価は2000u/mgの値を上回る。

意外にもこれらGAGのインビトロ及びインビボテストによれば、種々の精製エラスターゼに対して有効であることが判明した。

より詳細には、これら物質は、エラスターゼ/抗エラスターゼの比のアンバランスに関連した結合組織の病理に主として関与する酵素たる白血球エラスターゼに対して強力な阻害効果及び高い選択性を有する。

薬理学的に許容される塩の形態でもよい。

グリコサミノグリカンGAGは実質的に、ウロン酸-アミノ糖(又はその逆の)繰返し基本単位から形成される。この単位は生物学的に活性の天然GAG例えばヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸又はヒアルロン酸の多糖鎖又はオリゴ糖鎖中に検出される。これらの鎖中、ウロン酸基本単位は特にD-グルクロン酸又はL-イズロン酸構造に対応し、アミノ糖基本単位は(例えばヘパリン又はヘパラン硫酸中の)D-グルコサミンの構造又は前記の別の物質中のD-ガラクトサミン構造に対応する。

本文及び特許請求の範囲において、天然グリコサミノグリカン、その低分子量断片又は鎖、薬理学的に許容されるその塩をGAGと指称する。

ある種の天然物質は抗トロンビンⅢ(AT-Ⅲ)又はヘパリンの補因子Ⅱ(HCⅡ)に高いアフィニティをもつ鎖を含む。

この阻害は、多形核白血球中に白血球エラスターゼと共に存在し急性又は慢性の炎症性組織傷害の処でエラスターゼ活性に相乗効果を与えるカテプシンGにも有効であるという利点をもつ。

極めて重要な別の特徴によれば、これら物質はエラスターゼ阻害物質の血清中比率を増加し得る。

本発明の実施態様によれば、本発明の薬剤の製造に使用されるGAGはヘパリン又はヘパラン硫酸中で検出される如きD-グルコサミン-ウロン酸(L-イズロン酸又はD-グルクロン酸)の繰返し基本単位をベースとする。

本発明の好適具体例によれば、GAGがヘパリンである。

別の好適具体例によれば、使用GAGはヘパラン硫酸から成る。

更に別の好適具体例によれば、出発GAGはヘパリン又はヘパラン硫酸より小さい分子量をもつ。

特に、分子量(PM)は約10,000ドルトン未満である。

これら低分子量即ち低PMのGAGとしては特に以下の物質を挙げることができる。

ー特に1978年11月6日のフランス特許第7831357号及び第1追加特許たる1979年7月20日のフランス特許第7918873号に記載のヘパリンのアルコール抽出によって得られたムコ多糖。

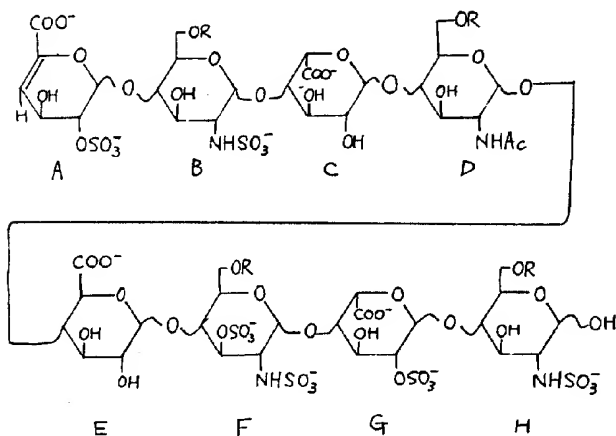
主特許の特徴によれば、これら生成物は分子量約2000～8000ドルトンでYin-Wessler価/USP価の比が2以上の鎖の混合物から形成される。記載の生成物のうちでYW/USP比が3から5のオーダで平均分子量3000～5500のものを以後CY216と指称する。

ー前記フランス特許第7831357号の第2追加特許たる1980年3月20日のフランス特許第8006282号及び1981年4月10日のフランス特許出願第8107283号に記載の亜硝酸によるヘパリンの調整解重合によ

ニティをもつ8個以下の糖基本単位から形成されるオリゴ糖。

変形例によれば、これらオリゴ糖は亜硝酸による調整解重合によって生成され、2,5-無水マンノ構造の基によって終結する。

別の変形例によれば、鎖の初端の基本単位はヘパリナーゼによるヘパリンの調整解重合によって形成される不飽和ウロン酸基本単位に対応する。特に、これらオリゴ糖は式



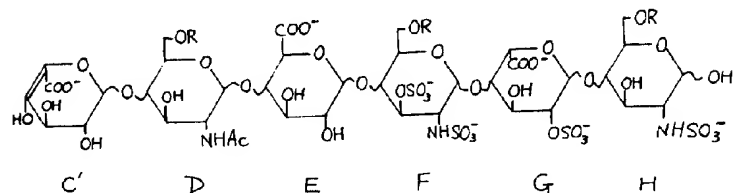
り得られるムコ多糖。これら生成物は一般的に上記特性に対応し2,5-無水-マンノ構造の基で終結する。

特に、2,5-無水-マンニール末端をもつタイプのムコ多糖(以後CY222と指称)又は2,5-無水-マンニール酸末端をもつタイプのムコ多糖が挙げられる。より特定のには、多数グリコシド鎖の分子量は2000から3000のオーダ特に約2000～2600である。YW価/USP価の比は特に10以上でYin-Wessler価は約200u/μg以上である。

ー1984年10月18日のフランス特許出願第8415978号に記載の主として、(1)平均分子量3000～6000ドルトン特に約4000～5000の鎖で、(2)YW/USP比が10未満特に約6～3で、(3)2,5-無水-マンノ構造の基本単位で終結する鎖から形成されたムコ多糖。
ー1980年10月6日の欧州特許出願第80401425号に記載の如き実質的に2000u/μgの高いYin-Wessler価と実質的に0の低いUSP価とをもち高いATⅢアフィ

で示される構造ABCDEFGHの8糖から形成される。

ー1981年4月29日のフランス特許出願第8108604号によって得られるような前記8糖をヘパリナーゼによって調整解重合して得られるような6糖の均質組成物。特にこれら組成物は、式



で示される。

ー生成物CY222、CY216、ヘパリン又はその他のGAGをSephadexの如き物質で処理するか又はイオン強度勾配によるクロマトグラフィー処理して得られるような均質重合度のオリゴ糖又は多糖。
ーヘパリンに過ヨウ素酸塩を作用させ次に塩基性媒体中で処理して得られるようなGAG。

—動物器官の処理によって得られるGAG組成物に対応する所謂完全GAG。

—ヘパリナーゼ又は亜硝酸によるヘパリンの解重合と、AT-IIIへの固定配列をもつ画分の分離と、これら画分のゲル濾過とによって得られるような種々の重合度のGAG断片。

これらGAG断片として例えば、重合度(dp)が12より大きいGAG断片及び重合度12未満特に12,10,8,6,4のGAG断片がある。

これらの種々のGAGは非限定的な例として示されただけであり、出願人名義の種々の特許及び特許出願で使用され記載された出願人が十分に知っている生成物であることは理解されよう。

本発明の医薬を製造するために他のいかなるグリコサミノグリカンの使用も可能である。

更に、本発明の別の特徴によれば、使用GAGが、例えばデルマタン硫酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸又はヒアルロン酸中で検出されるよ

これは、—OH基の一部又は大部分又は全部が硫酸エステル基 SO_3^- によって置換された前記の如き生成物を意味する。

このタイプの生成物は特に、出願人による同日のフランス特許出願に記載のタイプの生成物であり、該フランス特許出願に記載の方法を用いて有機溶媒に可溶な塩の形態の所与のGAGの硫酸化によって生成されるのが有利である。

硫酸化度は約2〜約4の値で変わる。

これらGAGは、アミノ糖基本単位の2位の $-\text{NH}\text{SO}_3^-$ 基の一部又は大部分又は全部が $-\text{NH}$ -アシル基特に $-\text{NH}$ -アセチル基で置換された生成物を包含する。

インビトロモデル反応及びインビボ動物モデル中の前記GAGの作用をテストするとその強力な効力が証明された。

この作用に関する研究の結果、白血球エラスターゼとカテプシンG(エラスターゼの活性に相乗効果を与える)とに対する強力な阻害効果、高度な

うなD-ガラクトサミン-ウロン酸の繰返し基本単位をベースとする。

1つの具体例ではデルマタン硫酸が有利である。

別の具体例では使用GAGがコンドロイチン又はコンドロイチン硫酸から形成される。

更に別の具体例ではGAGがヒアルロン酸から構成される。

本発明の別の特徴によれば、出発GAGの重合度が均一である。これらGAGは例えば、ヘパリン解重合混合物のゲル濾過によって得られる。偶数の重合度の鎖から形成された重合混合物を使用するとこの分離が容易である。

偶数の重合度の鎖から形成される解重合混合物を使用して容易に行なわれる処理の変形例によれば、GAG混合物をゲル濾過処理して重合度の均質なGAGを得る。

本発明の別の特徴によれば、硫酸化(sulfatation)プロフィールが修正されたGAGが使用される。

選択性及び低濃度(0.5ng/ml)が証明される。別の重要な知見は、これら生成物が白血球エラスターゼに与える阻害効果とカテプシンGに与える阻害効果との間に十分な相関性が見られることである。

後述の実施例に記載のごとく、これら生成物はハムスターに対して行ったインビボテストで、血清のエラスターゼ活性を強力に阻害し、またエラスターゼ阻害物質特に $\alpha 1\text{PI}$ の血清中濃度を次第に増加させるという重要な結果が判明した。

これらGAGの効力の範囲は、アテローム形成症に関与する細胞付着因子を構成するフィブロネクチンの生合成の阻害に及ぶ。

これらGAGはまた、コラーゲンの合成阻害、特にI+III型のコラーゲンの合成阻害に作用する。

GAGの別の特性は、動脈プロテオグリカンによる軽量リポタンパク質(LDL)の沈降に関与することである。アテローム沈着の形成後に不溶性の遊離LDL-動脈プロテオグリカン複合体の形成が生じ

ることは一般に認められている。これらの現象が総合されて動脈硬化症及び血管閉塞症の進行に重大な影響を与える。

上記の特性をもつだけでなく更にこれら生成物は無毒であることが既知なので結合組織の病理特に肺、血管及び関節の病理に有効な薬剤の製造に特に重要である。

本発明の薬剤の特徴は、有効量の上記GAGを薬剤賦形剤と共に含有することである。これら薬剤は発熱性物質を含まない。

好適組成物は経口投与に適した薬剤担体を含む。対応する有利な剤形はカプセル剤、錠剤又はタブレット剤、丸剤、又はリボソームである。

別の薬剤組成物は、GAGを直腸投与に適した賦形剤と共に含む。対応する剤形は坐薬剤である。

別の薬剤組成物においてGAGはエアゾール又は軟膏の形態である。

本発明は更に静脈内、筋肉内又は皮下注射によ

本発明組成物は更に、例えば動脈硬化症で特に血管壁、肺線維症で肺、肝硬変で肝臓の組織中で生じるコラーゲン増加を抑制する。

本発明組成物の抗エラスターゼ活性はまた、毛細管の基底層の侵食が脳及び血管の障害の主因となっている病気又は骨関節疾患の治療にも適する。

ヒトに使用できる用量の一例を以下に示す。用量は、投与形態次第で約1mg〜約1.5g/24時間の範囲であり、静脈内投与では好ましくは5〜500mg/日例えば200mg/24時間のオーグ、経口投与では100〜500mg/日である。

これら投与量は勿論、各患者毎に行った予備血液分析の結果とかかっている病気の種類と全体の健康状態とに応じて各患者毎に調整される。

本発明GAGは更に、別の物質のプロテアーゼ阻害活性をテストするための比較コントロールとして実験室で使用する生物試薬の成分として使用される。

て投与できる無菌又は殺菌可能な注射薬に係る。

これら溶液は、皮下注射で投与されるときは1〜200mg/ml好ましくは20〜150mg/mlのGAGを含むのが有利である。これら溶液が例えば静脈内注射又は灌流によって投与されるときは30〜100mg/ml特に40〜50mg/mlのGAGを含む。

かかる薬剤は既製の使い捨て注射器の形態で供給されるのが有利である。

本発明の薬剤組成物は特に、心血管、骨関節、肺又はその他の結合組織の病変を含む老人病の予防又は治療に有効である。

これら組成物は特に、エラスターゼの不均衡、特に白血球エラスターゼー抗エラスターゼの不均衡の予防及び治療に適している。

本発明の組成物はまた、フィブロンectin及びコラーゲンに対する阻害効果がありまたLDLとの相互作用に対する阻害効果があるのでアテローム形成症にも極めて重要である。

本発明の特徴及び利点は以下の実施例によってより十分に理解されよう。

実施例1

血清の抗弾性組織分解活性と抗~~セリ~~プロテアーゼの阻害能とに関するインビトロテスト

(a)血清弾性組織分解活性の定量

以下の基本手順で定量する。アミノ酸とパラニトロアニリド化合物とのアミド結合をタンパク質分解によって破壊しパラニトロアニリド化合物を遊離する。

不安定なパラニトロアニリドは環形成して410nmに最大吸収をもつ安定な化合物パラニトロアニリンを形成する。

エラスターゼ活性を410nmで比色的に算定すると加水分解した基質のモル量に比例する。

N-メチル-2-ピロリドン中にスクシノイル-トリアラニル-パラニトロアニリドを79mg/mlの割合で含む125mMの合成基質の溶液を調製する。

エラスターゼとバッファ(トリス/HCl 0.1M pH8、 NaN_3 0.02%、Brij洗剤0.1%、 NaClO $\frac{1}{1000}$ M)とを漸増量で添加する。

調製物を37℃で1時間インキュベートし20 μ lのPMSFを添加して反応を停止させる。

光学濃度をエラスターゼ濃度の関数として測定して酵素活性を測定する(酵素の量はngのオーダーである)。

(b)エラスターゼに対する血清阻害能の定量

一定量の基本手順

ハムスターの血清中に漸増量の阻害物質を添加した後に残留エラスターゼ活性を定量する。

このために、 α 1-プロテアーゼ阻害物質と α 2-マクログロブリンとを含有する種々の量の血清を既知量のブタ膵臓エラスターゼと共にブレインキュベートする。このブレインキュベーション後に合成基質STANAに対して残留酵素活性を定量する。

つ。

—血清添加量の関数として酵素活性の定常減少を示す相

—活性酵素の一部を残存させた余剰量の血清阻害物質に対応するプラトー。

即ち、 α 2マクログロブリンはエラスターゼ活性の一部しか阻害しない。使用したSTANAの如き小基質に接近可能な酵素の活性中心は残存する。

コントロール血清のプロテアーゼ阻害能とグリコサミノグリカン誘導体で処理した血清の同じ阻害能とを比較すると、種々の血清阻害能を有効且つ定量的に比較できるグラフの下降部分が存在する。

種々のエラスターゼに対するヘパリン、CY216、CY222及びdp>12の画分によって得られた結果を以下に示す。

(1)ラットの白血球エラスターゼに対するテスト

エラスターゼ活性(%)を被検物質の濃度 μ g/ml

純酢酸(100 μ l)を添加して反応を停止させる。

—処理モード

(基質と共に1時間インキュベートした光学濃度0.8に対応する)80ngの酵素を0~30 μ lの範囲の種々の量の基質と共に室温で30分間ブレインキュベートする。

ハムスターの血清を20倍に希釈する。これは、エラスターゼとのインキュベーションを1時間維持した後にあまり多くない定量的な阻害を得るためである。酵素と血清とを30分間存在させると酵素-阻害物質複合体が形成される。次に20 μ lの基質と、1mlの最終溶液を得るために十分な量のバッファとを添加する。

調製物を1時間インキュベートし、100 μ lの純酢酸を添加してpHを低下させることによって反応を停止させる。

残留エラスターゼ活性を410nmの光学濃度で測定する。観察されたグラフは2つの主要な相をも

の関数として測定する。結果を第1図に示す。第1図は、ヘパリンによる結果をグラフ-O-O、CY216による結果をグラフ-X-X、CY222による結果をグラフ-.-.-、dp>12の画分による結果をグラフ-Δ-Δで夫々示す。

これらグラフより、被検物質が0.05 μ g/mlという低濃度でエラスターゼ活性の約80%を阻害することが判明する。

—ラットのカテブシンGに対するテスト

残留酵素活性を被検物質の関数として測定する。

第2図は、エラスターゼ及びカテブシンGに対してヘパリン(a)、CY216(b)、CY222(c)、dp12の画分(d)、dp>12の画分(e)で得られた結果を示す。

これらのグラフより、白血球エラスターゼ及びカテブシンGの夫々に対するこれら物質の阻害作用の間に十分な相関性が存在することは明らかである。

ヘパリン、CY216及びCY222は白血球エラスター

ゼよりもカテプシンGを強力に阻害するが、dp12の画分はカテプシンGよりもエラスターゼを阻害する。

(2) プタの膵臓エラスターゼに関するテスト

以下のごとく処理する。

繊維性エラスチンを含むアガロースゲルをペトリ皿に入れ、阻害物質添加及び不添加の既知量のエラスターゼを小カップから付着させる。次に溶解領域の発達を観察する。

10mg/mlの高濃度の被検化合物が膵臓エラスターゼの作用を強力に阻害することが確認された。

(3) エラスターゼのタイプのプロテアーゼ(プタの大動脈の平滑筋細胞(セリンプロテアーゼ)とプタの大動脈の外膜の線維芽細胞(金属プロテアーゼ)に対するテスト

10mg/mlより高い濃度で被検物質によるエラスターゼの阻害効果が得られる。

実施例 3: ハムスターの正常血清または処理血清中のエラスターゼ/抗-エラスターゼ平衡に対する本発明の医薬の作用の *in vivo* 研究

次の3群のハムスターに対して行なった実験の結果を以下に挙げる。

— 第1群 = 対照10匹

— 第2群 = CY216分子で6週間処理したハムスター10匹

— 第3群 = CY222分子で6週間処理したハムスター10匹。

この処理は、100gのハムスターに6週間毎日分子2mgを注射して行なう。この用量は治療量と考えられる。

a) 循環血清のエラスターゼ活性の測定

上記処理の間毎週頸部から血液試料を採取して循環血のエラスターゼ活性の変化を追跡する。

実施例 2: ハムスター血清のエラスターゼおよび阻害活性に対する作用—血清のエラスターゼ活性の阻害と供試化合物の濃度との関係

合成基質の $\text{Suc}(\text{Ala})_3 - \text{pNA}$ について定量し、結果は化合物を添加していない血清単独の場合(対照)の活性を100%として相対活性(%)で示す。

これらの結果によってCY216とCY222の分子の存在下での血清の弾性組織分解活性の不活化が立証される。すなわち、これらの化合物の濃度は0.2ng/mlという低濃度でも血清1ml中に含まれる弾性組織分解活性の20%を不活化することができるが示される。特に化合物CY216の場合は指数関数的な用量-効果の関係がある。ヘパリンでは同じ用量で不活性化は全くみられなかった。

試料は化合物の皮下注射の1時間後、2時間後、4時間後、7時間後および24時間後に採取する。こうすると、化合物の投与に応じた酵素反応の進展の動静を追跡できる。動物は1群が10匹であるので、供試化合物の皮下注射の1時間後に各群の2匹のハムスターから600μl採血し、その後注射後2時間、4時間、7時間および24時間の時点で別の2匹のハムスターから順に600μl採取する。得られた血清のエラスターゼ活性を第3図のヒストグラムに示す(供試化合物の注射後採血までの時間は横軸に示した。なお、実験までの全処理時間(1, 2, 3週)も示してある。)

結果が示しているように、処理後第1週目からエラスターゼ活性の減少を認めることができ、この減少はPMがヘパリンより小さい分子の注射の2時間後に最大になる。次に、24時間後には(全く処理していないハムスターの血清の値で示され

る) 正常の値に戻る傾向が認められる。

この効果は6週間の処理の間処理が長引くにつれて匹敵するようになる。

これらの結果から、処理動物の血清の弾性組織分解活性に対するCY物質の作用は、CY分子を直接血清に添加した際にみられるin vitroにおける血清の弾性組織分解活性に対する不活化と同じ方向に働く結論できる。さらにin vivoで見られたこれらの結果は、循環血液中のCY濃度が減少するにつれて効果が減少することを示唆しており、このこともin vitroで得られた結果を支持している。

b) 肺臓エラスターゼに対する血清の阻害能の測定

用いた手順プロトコルは既に記載したものと同一である。3週間の処理の間血清中エラスターゼ阻害物質の割合の増加が認められる。この実験は

およびCY222 (各々20 μ gと100 μ gの用量)を用いる。

インキュベーション後、細胞層を採取し、培地を傾斜し、1回洗い、H₂Oに対して透析し、次に0.5M酢酸に対して透析し、ペプシン処理(pepsinisation)してコラーゲンを可溶化する(100 μ g/ml, 2×24^h 4℃)。

可溶性のペプシン画分は放射性ヒドロキシプロリン全体のうち95%を含んでいる。(NH₄)₂SO₄ (172mg/ml)を用いて沈殿させた後Rojo Kind法に従ってヒドロキシ(³H)プロリンと(³H)プロリンの放射能を測定する。

SDS-PAGE (Laemmli, 7.5%) 上で電気泳動する。

α 1鎖と α 2鎖に相当するゾーンを切り出し、各鎖の放射能を測定する。

得られた結果を下の表に示す。

気腫におけるヘパリン、その画分および断片ならびにその過硫酸化(sursulfated)誘導体の治療価を予言する。気腫の特徴は弾性組織分解活性の増大に帰因する肺の弾性組織の損失であり、エラスターゼの減少を伴うことが多い。阻害能については、Bulletin Europeen de Physiopathologie Respiratoire (1980) Vol.18, 補遺, 特に199~206頁、ならびに同刊行物の別の論文を参照されたい。処理の4週間後に肺臓エラスターゼに対する阻害能の増大傾向がみられる(第4図のヒストグラム参照)。

実施例4: コラーゲンの生合成の阻害に対するGAGの作用の研究

ブタ大動脈(第四路)の平滑筋細胞を箱当り細胞2.5×10⁶個の割合で用いる。トレーサーとしてトリチウム化プロリンを加えて24時間インキュベートする。対照(4箱), ヘパリン, CY216

この結果を検べると、コラーゲンの生合成に対するGAGの阻害効果が大きいことがわかる。

ヘパリンとCY216について用量効果があることに注意されたい。阻害は20 μ gよりも100 μ gの用量の時の方が大きい。その代わりにCY222の場合は20 μ gでも強い阻害がみられる。

表

合成されたコラーゲンⅢ型/ Ⅰ型+Ⅱ型 (%)	ヒドロキシ (^3H) プロリン/ 全放射能 (%)	対照 (%)		
47%	1.3%		2400	対 照
7% 10%	1.1% 0.4%	67% 18%		ヘパリン 20 μg ヘパリン 100 μg
28% 24%	1.3% 0.4%	77% 23%		CY 216 20 μg 100 μg
44% 37%	0~0.05% 0~0.05%	0~1% 0~1%		CY 220 20 μg 100 μg

胞内画分を得、フィブロネクチン中に特異的に取り込まれた放射能画分を免疫沈降によって測定する。下記表に、3時間後と6時間後にデオキシコール酸抽出物中に取り込まれた ^{35}S -メチオニンとアクリルアミドゲル電気泳動で免疫沈降させたものから単離したフィブロネクチンのバンド中にみられる放射能の割合(%)を示す。ヘパリノイドの存在下でフィブロネクチン中にとり込まれたアイソトープの割合の約50%が阻害されることがわかる。

実施例6： フィブロネクチンの生合成のGAGによる阻害
 プタ大動脈の平滑筋細胞 - 2.5×10^6 個/箱。CY 216, CY 222 およびヘパリン - 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。インキュベーション - 3時間および6時間。

デオキシコール酸抽出物(膜画分)およびフィブ

本発明の医薬の製造に用いたGAGはさらに、コラーゲンⅠ型+Ⅱ型と比較してⅢ型を選択的に阻害するという定性的作用を示す。

実施例5： 平滑筋細胞によるフィブロネクチンの生合成に対するGAGの作用

プタ大動脈(第四路)の平滑筋細胞を箱当たり 2.5×10^6 個用いる。各実験で3個ずつまたは4個ずつで用いた各箱に何も加えない(対照)か、あるいはCY 216 か 222を20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で加え、他の箱にはCY 216 と 222を100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、すなわち箱当たり300 μg 、また同様にヘパリンを加える。

使用したトレーサーは ^{35}S -メチオニン(1箱に付き5 μCi)であり、使用したインキュベーションの時間はフィブロネクチンの生合成が速いために3時間と6時間の2種にする。

インキュベーションし、培地を傾斜し、洗浄した後、デオキシコール酸塩で抽出して膜および細

ロネクチンの免疫沈降物内の放射能定量 - ポリアクリルアミドゲル上でのバンドの分離、切り出しおよび放射能計数後

フィブロネクチン内に取り込まれ、認められた放射能(%)

	3時間	阻害%	6時間	阻害%
対 照	70.6		31.7	
抽出物中の全放射能 dpm/ 10^6 細胞:				
45,800 $\times 3.5 =$				
160300.00 \pm 5600 (s.d.)				
CY 216 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	39.2	44	25.0	21
CY 216 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	38.4	46	24.1	24
CY 222 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	36.1	49	21.0	34
CY 222 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	37.3	47	20.2	36
ヘパリン 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	35.1	50	20.2	36
ヘパリン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	33.7	52	14.8	47

これらの結果は試験した条件のフィブロネクチンの生合成に対するGAGの阻害作用を明らかに示している。

実施例7: GAG s.s.の白血球エラスターゼとカテプシンGに対する活性のin vitroテスト (s.s.は硫酸化プロフィルの修正されたGAGをさす)

白血球エラスターゼはラットの胸膜浸出液から得た多形核白血球を用いて調製した。基質はN-スクシニルトリアラニンパラニトロアニリドであり、酵素活性は酵素を供試化合物と共に室温(20℃)で1時間インキュベートしてから測定する。次に基質を加え、37℃で20時間インキュベートし、410nmで読み取る。

ヒト多形核白血球から得たヒトカテプシンGの場合は基質としてアゾカゼインを用いて定量する。上と同様に、酵素を供試化合物と共に室温で1時

間インキュベートし、次にアゾカゼインを加え、混合物を37℃で5時間インキュベートし、最終濃度5%のトリクロロ酢酸で沈澱させ、366nmで読み取る。

供試化合物と、エラスターゼおよびカテプシンGに対する阻害活性とを下記表に示す。

また硫酸化プロフィルの修正されていない化合物も一緒に挙げる。

B'の部分に示したテストは濃度0.18MのNaClの存在下で行なったものである。

テストしたいろいろな誘導体について良好な阻害活性がみられた。

硫酸化を過多にすると阻害は増強される。(エラスターゼは過硫酸化CY216で100%阻害され、カテプシンGは過硫酸化ヘパリンで59%、過硫酸化CY216で65%阻害される)。分子量が一定であれば阻害は過硫酸化化合物の方が強い。この現

象は、阻害活性をほとんど全くもたず、過硫酸化されると強く阻害する最も低分子量のものの場合に最も著しい。

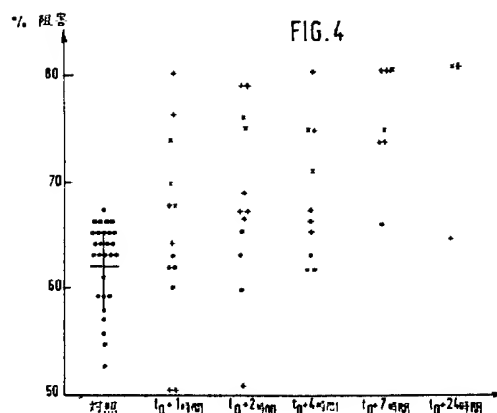
表

供試化合物	% 阻害			
	エラスターゼ a.	b.	カテプシン G C.	d.
A) ヘパリン (ナトリウム塩)	100	100	49	59
B) CY222 のセファロース 分画で得たオリゴ糖				
dp:				
12	63		50	
12	19		45	
10	22		30	
B')				
dp:				
16	82	100	40	60
22	91		53	
20	92		54	
12	92	97	46	51
8	53	95	34	53
6	38	91	8	43
4	28	87	7	42
C) CY216, CY216 Dおよび誘導体				
-CY216 (ナトリウム塩)	90		55	
-CY216 D (テトラブチルアンモニウム塩)	78	100	52	
-CYD216 (O-アセチル化)	98		49	

aとcは天然生成物の硫酸化率を有する物質またはその断片での測定、
bとdは硫酸化プロフィルが修正された物質での測定に対応する。

4. 図面の簡単な説明

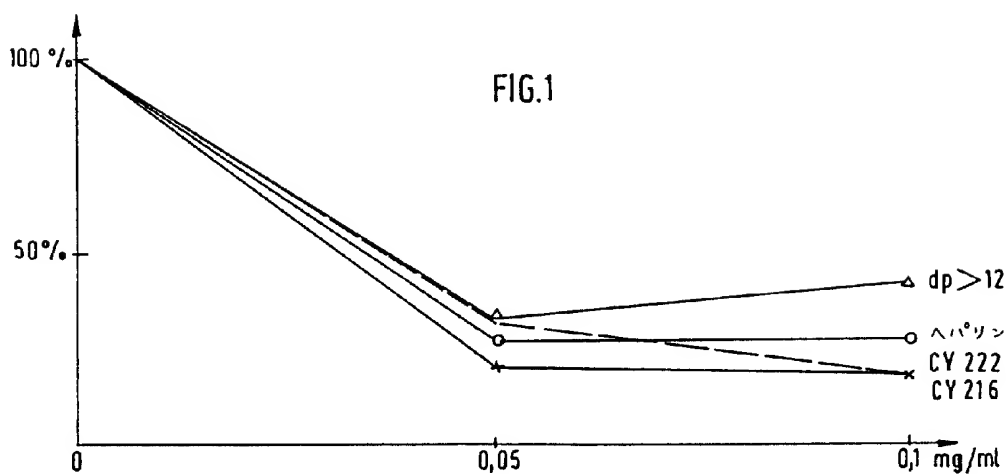
第1図は供試化合物の濃度に対するエラスターゼ活性を示すグラフ、第2図はヘパリン(a)、CY 216 (b)、CY 222 (c)、画分dp12 (d) および画分dp>12 (e) で得られたエラスターゼおよびカテプシンGに対する阻害活性を示すヒストグラム、第3図は本発明の薬剤の血清エラスターゼ活性に対する影響を示す図、第4図は本発明の薬剤の血清のエラスターゼ阻害能に対する影響を示す図である。

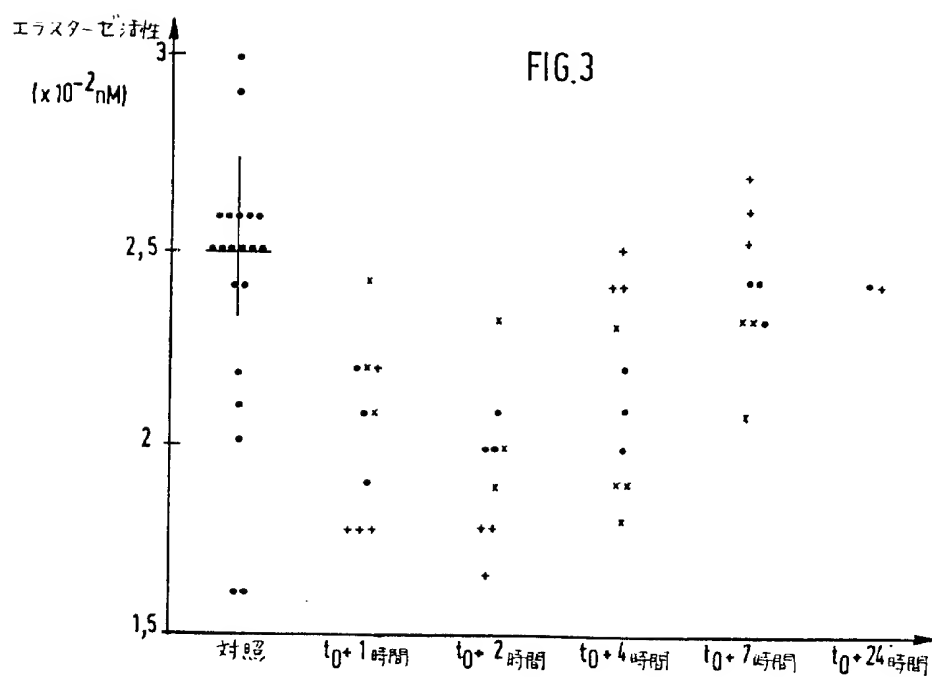
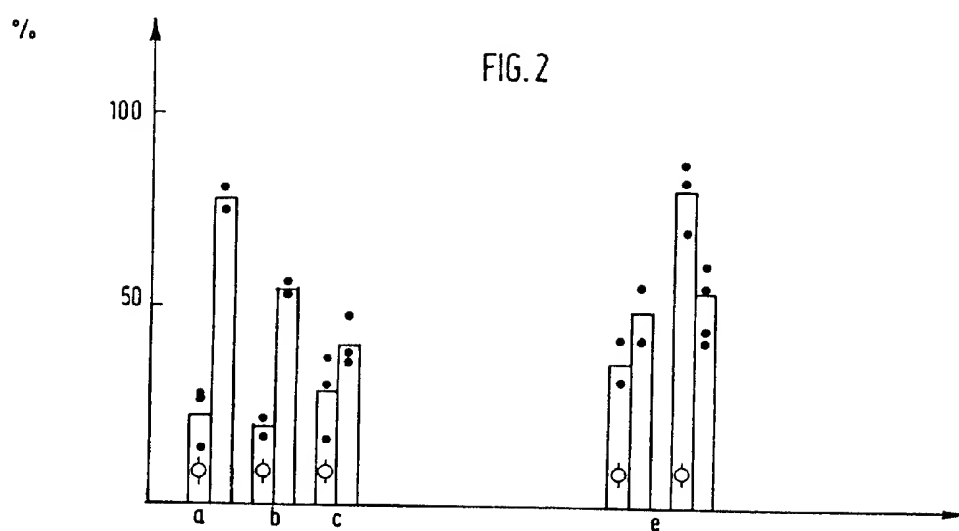


ヒストグラム 血清抗プロテアーゼの阻害能: CY 216 あらび
222分子による処理後1週間, + 2週後, X 3週後,
+ 4週後

出願人 サノファイ
代理人 弁護士 川口 義雄
代理人 弁護士 中村 至

図面の浄書(内容に変更なし)





第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁴

A 61 K 31/73

C 08 B 37/10

識別記号

ACD
ACS
AGZ

庁内整理番号

7133-4C

⑦2発 明 者 ジャン・ショアイ フランス国、75007・パリ、リュ・サンーギョーム、21

手続補正書

昭和61年8月14日

特許庁長官 黒田 明 雄 殿



8. 補正の内容

- (1) 願書中、出願人の代表者を別紙の通り補充する。
- (2) 正式図面を別紙の通り補充する。(内容に変更なし)
- (3) 委任状・法人格証明書及び同訳文を別紙の通り補充する。

1. 事件の表示 昭和61年特許願第163490号

2. 発明の名称 結合組織病理において有効な医薬の製造に使用する多糖およびオリゴ糖

3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人

名 称 サノフィ

4. 代 理 人 東京都新宿区新宿 1丁目 1番14号 山田ビル
(郵便番号 160) 電話 (03) 354-8623
(6200) 弁理士 川 口 義 雄

(ほか 1名)



5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象 願書中、出願人の代表者の欄、図面及び
委任状・法人格証明書



尚、同日付にて本願に関する優先権主張証明書差出書を提出致しました。